



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0084634
(43) 공개일자 2017년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1007 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0003903
(22) 출원일자 2016년01월12일
심사청구일자 2016년01월12일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
오현명
경기도 화성시 송산면 사강시장길43번길 9-15
김정희
경상남도 거제시 중곡로5길 11 (고현동, 덕진휴먼
빌) 905호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤여강

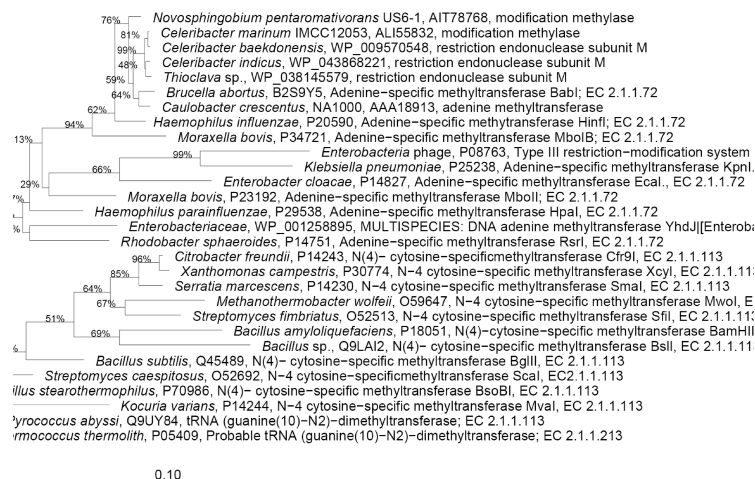
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 해양 미생물에서 분리한 신규한 DNA 메틸라아제 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해양 미생물 알파프로박테리아 균주 IMCC12053로부터 분리된 신규의 외향고리 DNA 아미노 그룹 메틸라아제 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 해양 미생물에서 동정된 DNA 메틸라아제 및 이를 암호화하는 DNA 메틸라아제 유전자를 제공한다. 유전자를 발현제조할 벡터에 클로닝하고 형질전환된 세포에서 발현하여 DNA 메틸라아제를 대량 생산 및 분리하는 방법을 제공하고 있다. 본 발명의 신규 DNA 메틸트랜스퍼라아제는 제한효소 자리 보호하고 DNA의 물리적 물성 변화를 유도하여 제한효소 인식 서열을 감소시킴으로써 효소 특이성을 증가시키는 효과를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 15/74 (2013.01)

(72) 발명자

양정안

부산광역시 영도구 은빛길 76 (동삼동)

권개경

경기도 안산시 상록구 성호로5길 7 (일동), 2층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A2056424

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 해양 우점 세균에 감염하는 박테리오파지의 기능 유전자 연구

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교산학협력단

연구기간 2015.05.01 ~ 2017.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM59150

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 다부처유전체사업

연구과제명 고온·혐기성 미생물 유전체 해독 및 활용 기반 연구

기 여 율 1/2

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 2를 포함하는 신규한 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단백질은 알파프로박테리아 균주로부터 분리된 것을 특징으로 하는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질.

청구항 3

제 1 항의 단백질을 암호화하는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 유전자.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 유전자는 서열 번호 1의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제 4항의 유전자 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제 5 항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 세포는 알파프로박테리아 또는 대장균인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 8

- (a) 제 6 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양된 세포로부터 메틸라아제를 분리하는 것을 특징으로 하는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 미생물에서 분리된 신규한 DNA 메틸라아제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세균에 있어서 DNA 메틸화(methylation)는 유전체의 무결성(genome integrity) 유지 및 유전자 발현의 조절 기작에 관여한다(Gonzalez, Kozdon, McAdams *et al.*, 2014). 세포주기-조절 메틸트랜스퍼라아제(cell cycle-regulated methyltransferase; ccrM이라 한다.) 유전자는 대부분의 알파프로테오박테리아

(Alphaproteobacteria)에서 공통적으로 보존되어 있다(Gonzalez, Kozdon, McAdams, Shapiro & Collier, 2014).

[0004]

ccrM 단백질은 카울로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*) NA1000 등의 모델 미생물에서 유전자 발현을 조절하는 주요 기능 단백질 모델로 연구 되었다(Kozdon, Melfi, Luong *et al.*, 2013). ccrM 단백질은 또한 N⁶- 및 N⁴- 메틸라아제(methylase) 활성을 가지며, S-아데노실메티오닌(adenosylmethionine)을 기질로 하여 5'-GANTC-3'의 DNA 염기 서열상의 아데닌(adenine)을 N⁶-메틸아데노신(methyladenosine)으로 변환할 뿐 아니라 어떤 경우에 싸이토신 염기를 N⁴-메틸싸이토신(methylcytosine)으로 메틸화 할 수 있다(Jeltsch, Christ, Fatemi *et al.*, 1999). ccrM 형식의 N⁶- 및 N⁴-메틸라아제 활성은 염기의 탄소 고리에 달려있는 아민 그룹에 메틸기를 수식하기 때문에 C⁵-메틸싸이토신을 형성하는 메틸트랜스퍼라아제와 구분하여 외향고리의 아미노 메틸화(exocyclic amino modification)이라 불린다(Loenen & Raleigh, 2014).

[0005]

본 발명자들은 해양 유류 분해 세균인 *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1 (Sohn, Kwon, Kang *et al.*, 2004)의 드래프트 게놈(draft genome)을 분석하여 고분자의 방향성 탄화수소 분해유전자(aromatic-hydrocarbon-degrading genes)를 밝혀낸 바 있다(Luo, Kang, Kim *et al.*, 2012). *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1의 AIT78768은 5-GANTC-3' 염기 서열의 아데노신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁶-메틸아데노신을 생성하였다. *Novosphingobium pentaromaticivorans* US6-1의 AIT78768은 GpC 및 GpC 근처의 싸이토신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁴-메틸싸이토신을 생성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007]

(특허문헌 0001) 관련 선행 기술로는 미국공개특허 등록번호 제 6492168호 "Methyltransferase gene and enzyme"에서는 클로렐라(*Chlorella*) 바이러스 NYs-1으로부터 싸이토신을 메틸화하는 신규 GpC 메틸트랜스퍼라아제(GpC methyltransferase)(M.CviPI)를 개시하고 있다 (Kladde, Simpson & Xu, 2003, Kladde, Simpson & Xu, 2002, Kladde, Simpson & Xu, 2006).

(특허문헌 0002) Razin 등의 미국공개특허 등록번호 제 5296371호 "DNA encoding spiroplasma sp. dna methylase"는 스피로플라즈마(*Spiroplasma* sp.)로부터 CpG methyltransferase를 암호화하는 유전자의 염기 서열을 밝혔고 (Razin, Rottem & Renbaum, 1994), 유럽공개특허 등록번호 제 0412676호 "Method for producing the spiroplasma SP. DNA methylase"는 분리한 스피로플라즈마의 CpG 메틸트랜스퍼라아제를 호스트(host)에서 발현하여 생산하는 방법을 개시하고 있다 (Razin, Rottem & Renbaum, 1991, Razin, Rottem & Renbaum, 1995).

비특허문헌

[0008]

(비특허문헌 0001) CpG 메틸트랜스퍼라아제(M.SssI)는 이중가닥의 디뉴클레오타이드 인식 서열(double-stranded dinucleotide recognition sequence) 5'-CG-3'의 모든 싸이토신(C5)을 메틸화 한다(Renbaum, Abrahamove, Fainsod *et al.*, 1990).

(비특허문헌 0002) 클로렐라(*Chlorella*) 바이러스 NYs-1으로부터 클로닝한 GpC 메틸트랜스퍼라아제는 박테리아(*Escherichia coli*)와 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 발현하여 in vitro 상에서 GpC의 싸이토신을 메틸화 하였다(Xu, Kladde, Van Etten & Simpson, 1998)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명은 신규의 DNA 메틸트랜스퍼라아제 및 이를 암호화하는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 유전자를 제공하는 것을

목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기한 목적을 위하여 본 발명의 제 1의 형태는 서열번호 2의 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 제공한다. 상기 "단백질"란 용어는, 임의의 길이를 가지는 아미노산 중합체를 의미하는 것으로서, 암호화 및 비 암호화된 아미노산, 화학적 또는 생화학적으로 변형 또는 유도체화된 아미노산, 그리고 변형된 펩티드 주쇄를 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 제 2의 형태는 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 암호화 하는 유전자를 제공하는 것이다. 바람직하게는 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 유전자이다. 상기 "유전자"란 용어는, DNA에 의해 암호화된 RNA(또는 RNA에 의해 암호화된 DNA), 또는 RNA나 DNA에 의해 암호화되는 단백질을 의미하는 것으로서, 여기서 유전자는 통상적으로 단백질을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함할 뿐만 아니라, 인트론 및 기타 비-암호화 뉴클레오티드 서열을 포함 할 수도 있다.
- [0015] 본 발명의 제 3의 형태는 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 암호화 하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다. 상기 "벡터"는 또 다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 "발현벡터"로 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 등을 이용할 수 있다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다. 발현 벡터 내에 사용될 수 있는 기타 조절 요소로서는 전사 인핸서 요소와 전사 종결 인자를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Bitter와 다수 (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544]을 참조하시오.
- [0016] 발현 벡터는 특정 유형의 숙주 미생물에서만 사용하기 적당하며, 다른 미생물에서는 적당하지 않다. 그러나, 당업자는 통상의 실험을 통하여, 어느 특정 발현 벡터가 소정의 숙주 미생물에 적당한지를 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 숙주 유기체에 도입될 수 있으며, 이후 상기 벡터 내에 포함된 임의의 유전자의 자생력과 발현 여부에 대해 모니터링 된다. 발현 벡터는 또한, 발현시 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포를 선별 또는 동정하는데 유용한 하나 이상의 표현형적 특징을 부여하는, 하나 이상의 선별 마커 유전자도 함유할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 제 4의 형태는 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 암호화 하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다. 바람직하게는 상기 숙주세포는 원핵세포이다. 더 바람직하게는 상기 숙주세포는 알파프로박테리아 또는 대장균을 포함하는 그람 음성 세균이고, 가장 바람직하게는 상기 숙주세포는 알파프로박테리아이다.
- [0019] 상기 "형질전환"은 새로운 유전자 또는 존재하는 유전자의 여분의 복제본의 숙주 유기체 내로의 도입을 말한다. 형질 전환법으로서의 미세 주입법, DEAE 텍스트란 매개 형질 전환법과, 아세트산리튬의 존재 하에 열 충격을 주는 방법을 포함한다. 숙주 미생물을 형질 감염시키는데에 지질 복합체, 리포솜 및 덴드리머(dendrimer)도 사용될 수 있다.
- [0020] 형질 전환시, 대상 벡터가 도입된 숙주 세포를 동정하기 위하여, 다수의 방법들이 실시될 수 있다. 한 가지 대표적인 선별법은, 각각의 세포들을 계대 배양하여 각각의 콜로니를 형성시킨 다음, 원하는 유전자 생산물을 발현하는지 여부에 대해 테스트하는 과정을 포함한다. 다른 방법은, 발현 벡터 내에 포함된 선별 마커 유전자를 발현시켜, 주어진 표현형적 특징을 바탕으로 하여 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 과정을 포함한다. 당업자는 이와 같은 방법 또는 기타 당 업계에 통용되고 있는 방법을 이용하여, 유전자 변형된 숙주 세포를 동정할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 유전자가 숙주 세포에 도입되었는지 여부는 여러 가지 방법들(예를 들어, PCR, 서던 블롯 혼성화 또는 노던 블롯 혼성화)에 의해 확인할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 결과로 생성된 숙주 세포로부터 생산될 수 있으며, 목적으로 하는 특이 서열은 목적 서열에 특이적인 프라이머를 이용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 증폭된 생성물을 사용하여 아가로스 겔 전기 영동법, 폴리아크릴아미드겔 전기 영동법 또는 모세관 전기 영동법을

실시한 다음, 브롬화에티듐 또는 SYBR 그린 용액 등으로 염색을하거나, 또는 UV 검출법을 수행하여, DNA를 검출한다. 대안적으로, 목적 서열에 특이적인 핵산 프로브가 혼성화 반응에 사용될 수 있다. 특이적인 유전자 서열의 발현 여부는, 역전사 커플링된 PCR, 노던 블롯 혼성화를 통하여 상응하는 mRNA를 검출하거나, 또는 암호화된 유전자 생성물과 반응성인 항체를 사용하는 면역 검정법에 의해 확인될 수 있다. 대표적인 면역 검정법의 예로서는 ELISA, 방사성 면역 검정법 및 샌드위치 면역 검정법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 제 5 의 형태는 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 단백질을 이용한 DNA 메틸트랜스퍼라아제를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 신규 DNA 메틸트랜스퍼라아제는 제한효소 자리 보호하고 DNA의 물리적 물성 변화를 유도하여 제한효소 인식 서열을 감소시킴으로써 효소 특이성을 증가시킨다. 또한, CpG 또는 GpC 메틸화 관련 유전자 발현 조절 연구, DNA 메이저 그루브(major groove)의 염기서열 특이적 탐침 연구, 메틸화를 이용한 DNA의 3중 수소 표시(tritium-labeling)에 유용하게 이용된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도1은 세균과 고세균(archaea)의 다른 그룹의 균주들과 알파프로테오박테리아 균주의 ccrM 메틸트랜스퍼라아제 유전자 염기서열에 근거한 계통학적 유연관계를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 이 발명이 속 하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0030] <실시예 1> *Celeribacter marinus* IMCC12053 균주에서 DNA 메틸라아제 분리 및 염기 서열 비교

[0031] 해양환경에서 분리 동정된 *Celeribacter marinus* IMCC12053(Baek, Choi, Kang *et al.*, 2014)은 박테리오파아지 P12053L을 분리하는 숙주로 사용된 바 있다(Kang, Jang, Oh *et al.*, 2012).

[0032] 알파프로테오박테리아에 속하는 IMCC12053 균주를 SMRT(single-molecule, real-time) 방법(Eid, Fehr, Gray *et al.*, 2009)을 이용하여 미생물유전체 염기 서열 분석한 후, 유전체의 염기 서열상의 N⁶-메틸아데닌, 5-메틸싸이토신, 그리고 N⁴-메틸싸이토신의 특이적 키네틱 시그너처(specific kinetic signature)를 이용하여 염기 서열상의 아데노신 및 싸이토신의 메틸화 양상을 관찰할 수 있었다(Clark, Murray, Morgan *et al.*, 2011). SMRT 법을 이용한 IMCC12053 균주의 유전체 분석 결과를 이용하여 DNA 염기 서열상의 아데노신 및 싸이토신 염기 서열이 각각 N⁶-메틸아데노신 및 N⁴-메틸싸이토신 으로 메틸화 되는 것을 기록하고 그 패턴을 Gibbs motif sampler program(Lawrence, Altschul, Boguski *et al.*, 1993)을 이용하여 분석하였다. 유전체 분석 결과, *Celeribacter marinus* IMCC12053는 5'-GANTC-3'의 아데노신을 N⁶-메틸아데노신으로 변형하는 유전자를 가지고 있으며, NCBI Conserved Domain Database의 CDD search (Marchler-Bauer, Derbyshire, Gonzales *et al.*, 2015)를 통해서 ccrM을 포함하는 유사 서열을 구분할 수 있었다(표 1).

표 1

알파프로박테리아 균주(strain)들 간의 DNA 메틸트랜스퍼라아제 비교

Organism	Locus tag	Description	CDD result	Comment
<i>Caulobacter vibrioides</i> NA1000	CCNA_00382	adenine-specific methyltransferase		ccrM
	CCNA_00869	Type II restriction enzyme, methylase subunits		adenine methyltransferase with an associated restriction enzyme domain
	CCNA_01085	DNA-cytosine methyltransferase		
	CCNA_03741	DNA-cytosine methyltransferase		
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1	AIT78768	DNA modification methylase		restriction endonuclease subunit M
	AIT79233	Type II restriction enzyme, methylase subunit YeeA		Annotated as "lactate dehydrogenase" (?)
<i>Celeribacter marinus</i> IMCC12053	IMCC12053_1885	DNA modification methylase		
	IMCC12053_605	Predicted N6-adenine-specific DNA methylase		
	IMCC12053_2040	DNA modification methylase		
	IMCC12053_3116	DNA modification methylase		
<i>Celeribacter baekdoensis</i> B30	B30_03115	adenine-specific methyltransferase		
	B30_06546	Predicted N6-adenine-specific DNA methylase		
<i>Celeribacter indicus</i> P73	P73_0385	adenine-specific methyltransferase		
	P73_4804	DNA-cytosine methyltransferase		
	P73_2233	Predicted N6-adenine-specific DNA methylase		
	P73_4789	C-5 cytosine-specific DNA methylase		

<실시예 2> DNA 메틸라아제의 CpG /CpG 특이적 효소 활성

알파프로박테리아 *Celeribacter marinus* IMCC12053 균주의 메틸화 효소(gi|937545064|gb|ALI55832.1)는 아데노신에 특이적인 메틸화 효소(adenosine-specific DNA methylase)인 동시에 N⁴-cytosine에 특이적인 메틸화 효소(N⁴-cytosine specific DNA methylase)임이 예측된다(참고 도 1). 이를 확인하기 위하여 *Celeribacter marinus* IMCC12053의 IMCC12053_18853(Genbank acc. ALI55832)은 5'-GANTC-3' 염기 서열의 아데노신의 외향고리의 아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁶-메틸아데노신을 생성하였다(표 2). *Celeribacter marinus* IMCC12053의 IMCC12053_18853 (Genbank acc. ALI55832)은 CpG 및 CpG 근처의 싸이토신의 외향고리의

아민(exocyclic amine)에 메틸기(methyl group)를 치환하여 N⁴-메틸싸이토신을 생성하였다(표 2).

표 2

IMCC12053 유전체에 의해 변형된 N⁴-메틸싸이토신 및 N⁶-메틸아데노신의 모티프

Motif Element	Left End	Right End	No. Motifs	Avg. Score (-10 LogP)
	-9	0	43	25.7
	-8	1	44	24.7
	-7	2	70	25.1
	-6	3	10	23.4
	-5	4	439	25.4
	-3	6	172	25.7
	-2	7	19	25.3
	-1	8	9	28.1
	0	9	19	27.8
	-9	0	65	51.9
	-8	1	35	51.9
	-4	5	1537	59.8
	-3	6	1110	59.3
	-2	7	11	26.2
	-1	8	9	21.8
	0	9	8	25.5

[0040]

[0043] 참고문헌

[0044] Baek, K., Choi, A., Kang, I. & Cho, J. C. (2014). *Celeribacter marinus* sp. nov., isolated from coastal seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 1323-1327.

[0045] Clark, T. A., Murray, I. A., Morgan, R. D., Kislyuk, A. O., Spittle, K. E., Boitano, M., Fomenkov, A.,

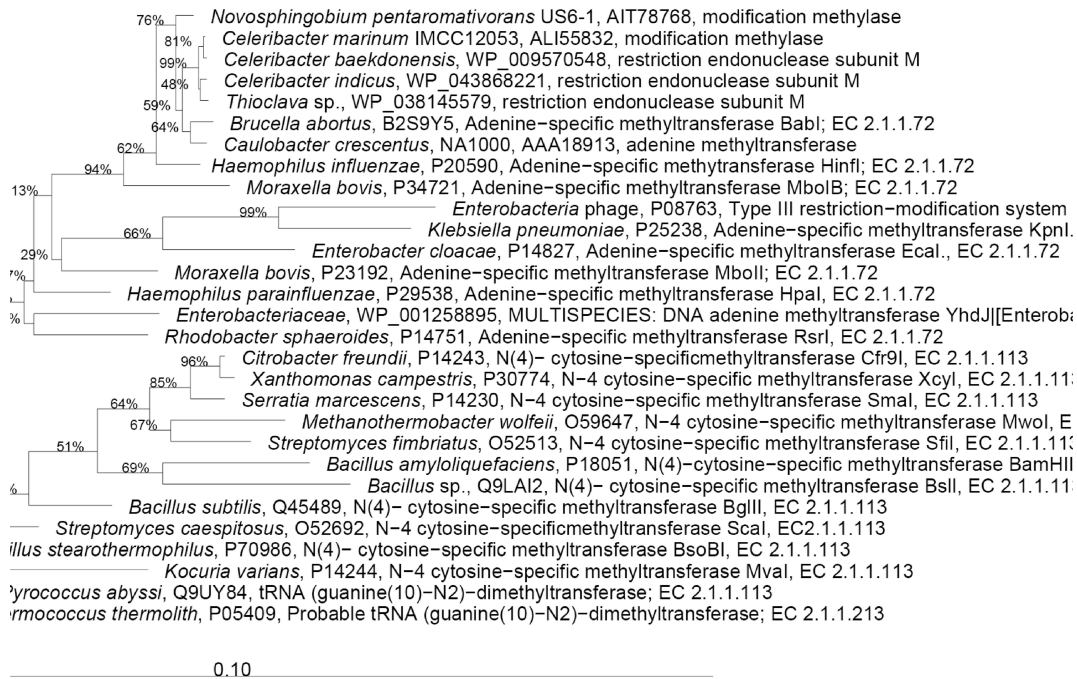
Roberts, R. J. & Korlach, J. (2011). Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*

- [0046] Eid, J., Fehr, A., Gray, J. & [Enter number of additional authors] other authors (2009). Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**, 133-138.
- [0047] Gonzalez, D., Kozdon, J. B., McAdams, H. H., Shapiro, L. & Collier, J. (2014). The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach. *Nucleic Acids Res* **42**, 3720-3735.
- [0048] Jeltsch, A., Christ, F., Fatemi, M. & Roth, M. (1999). On the substrate specificity of DNA methyltransferases. adenine-N⁶ DNA methyltransferases also modify cytosine residues at position N⁴. *J Biol Chem* **274**, 19538-19544.
- [0049] Kang, I., Jang, H., Oh, H. M. & Cho, J. C. (2012). Complete genome sequence of *Celeribacter bacteriophage* P12053L. *J Virol* **86**, 8339-8340.
- [0050] Kladde, M., Simpson, R. & Xu, M. (2003). Methyltransferase gene and enzyme. In: Google Patents.
- [0051] Kladde, M. P., Simpson, R. T. & Xu, M. (2002). Methyltransferase gene and enzyme. In: Google Patents.
- [0052] Kladde, M. P., Simpson, R. T. & Xu, M. (2006). Methyltransferase gene and enzyme. In: Google Patents.
- [0053] Kozdon, J. B., Melfi, M. D., Luong, K. & [Enter number of additional authors] other authors (2013). Global methylation state at base-pair resolution of the *Caulobacter* genome throughout the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E4658-4667.
- [0054] Lawrence, C. E., Altschul, S. F., Boguski, M. S., Liu, J. S., Neuwald, A. F. & Wootton, J. C. (1993). Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science* **262**, 208-214.
- [0055] Loenen, W. A. & Raleigh, E. A. (2014). The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Res* **42**, 56-69.
- [0056] Luo, Y. R., Kang, S. G., Kim, S. J., Kim, M. R., Li, N., Lee, J. H. & Kwon, K. K. (2012). Genome sequence of benzo(a)pyrene-degrading bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *J Bacteriol* **194**, 907.
- [0057] Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R. & [Enter number of additional authors] other authors (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* **43**, D222-D226.
- [0058] Razin, A., Rottem, S. & Renbaum, P. F. (1991). Method for producing the spiroplasma SP. DNA methylase. In: Google Patents.
- [0059] Razin, A., Rottem, S. & Renbaum, P. F. (1994). DNA encoding spiroplasma sp. dna methylase. In: Google Patents.
- [0060] Razin, A., Rottem, S. & Renbaum, P. F. (1995). Method for producing the spiroplasma SP. DNA methylase. In: Google Patents.
- [0061] Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G. G., Rottem, S. & Razin, A. (1990). Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the CpG DNA methylase from *Spiroplasma* sp. strain MQ1(M Sssl). *Nucleic Acids Res* **18**, 1145-1152.
- [0062] Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. & Macelis, D. (2010). REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **38**, D234-D236.
- [0063] Sohn, J. H., Kwon, K. K., Kang, J.-H., Jung, H.-B. & Kim, S.-J. (2004). *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1483-1487.
- [0064] Xu, M., Kladde, M. P., Van Etten, J. L. & Simpson, R. T. (1998). Cloning, characterization and

expression of the gene coding for a cytosine-5-DNA methyltransferase recognizing GpC. *Nucleic Acids Res* **26**, 3961-3966.

도면

도면1



서열목록

- <110> OH, Hyun-Myung
- <120> Marine Microbial DNA Methylase Genes and Enzymes Working on
Exocyclic Amine Group of Adenosine or Cytosine and Methods of
Preparation Thereof
- <130> PN150060
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1101
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> *Celeribacter marinus*
- <400> 1

atgacgacga aaacacgtga ggcagccaca gagctgccgc taaaccagat tcttggtggc 60
gattgcatcg agattatgaa cagccttccc gaaggatctg ttgacctgat ctttgcagat 120

ccccgtata acctacagct gcgcggtgat cttcacgcc ctgacaattc caaagttgac 180
gccgttgacg acgattggga tcagttcgat agctttaagg tctatgacaa ctttaccgcg 240
gattggcttg ccgccgcg cggtgtctc aaaccgaacg gtgcgatttg ggcgattggc 300
tcatacaca acgtgtaccg catgggcgcc gagctccaga accaaggttt ctggattctg 360
aatgacgttg tgtggcgcaa atcgaatccg atgccgaact ttcggggcaa acgattcacc 420
aatgcccacg aaaccattat ctgggcgtcc aaaaacgaag ccgcgaaata cacgttcaac 480
tatgaggcgc tcaagtcgtt gaatgagggg attcagatgc gtcctgattg ggtcttgccg 540

atgttgaacg gtggcgaacg tctcaaaaat gaagacggcg aaaaagcgca cccaacgcaa 600
aaaccgaaa gcttggtgca ccgtattctg gttggcacga ccaatcccgg cgatgtggtg 660
cttgaccctg tctttggcac gggcacaacc ggcgtgtgg ccaaatgct aggccgtgag 720
ttcatcgga tcgagcgga atccaatac cgcgaagtig ctcaaaaacg catcgacgcc 780
gtgcgcaagt tcgacaaaga cgcgttgctg gtctccacgt ccaagcgcg cgaaccacgt 840
gtgccgttcg gccagttggt tgagcgtggc atgttgctc cgggtgagga gttgtcctcc 900
ctgaacggtc gtcgcacggc aaaggtacgc gcagatggaa ctcttgctgc caacgatgct 960

aaagggtcca ttcacaggt cggtgcacat cttgagggcg cgccctcgtg caatggctgg 1020
acgtattgga cgttcaaacg ggatggaaaa caggttccga ttgatgtgct tcgtcaacaa 1080
atccgcgcgg agatgaacta g 1101

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Celeribacter marinus IMCC12053

<400> 2

Met Thr Thr Lys Thr Arg Glu Ala Ala Thr Glu Leu Pro Leu Asn Gln

1 5 10 15

Ile Leu Gly Gly Asp Cys Ile Glu Ile Met Asn Ser Leu Pro Glu Gly

20 25 30

Ser Val Asp Leu Ile Phe Ala Asp Pro Pro Tyr Asn Leu Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Asp Leu His Arg Pro Asp Asn Ser Lys Val Asp Ala Val Asp Asp
50 55 60
Asp Trp Asp Gln Phe Asp Ser Phe Lys Val Tyr Asp Asn Phe Thr Arg
65 70 75 80
Asp Trp Leu Ala Ala Ala Arg Arg Val Leu Lys Pro Asn Gly Ala Ile
85 90 95
Trp Ala Ile Gly Ser Tyr His Asn Val Tyr Arg Met Gly Ala Glu Leu
100 105 110
Gln Asn Gln Gly Phe Trp Ile Leu Asn Asp Val Val Trp Arg Lys Ser
115 120 125
Asn Pro Met Pro Asn Phe Arg Gly Lys Arg Phe Thr Asn Ala His Glu
130 135 140
Thr Ile Ile Trp Ala Ser Lys Asn Glu Ala Ala Lys Tyr Thr Phe Asn
145 150 155 160
Tyr Glu Ala Leu Lys Ser Leu Asn Glu Gly Ile Gln Met Arg Ser Asp
165 170 175
Trp Val Leu Pro Ile Cys Asn Gly Gly Glu Arg Leu Lys Asn Glu Asp
180 185 190
Gly Glu Lys Ala His Pro Thr Gln Lys Pro Glu Ser Leu Leu His Arg
195 200 205
Ile Leu Val Gly Thr Thr Asn Pro Gly Asp Val Val Leu Asp Pro Phe
210 215 220
Phe Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Val Ala Lys Met Leu Gly Arg Glu
225 230 235 240
Phe Ile Gly Ile Glu Arg Glu Ser Lys Tyr Arg Glu Val Ala Gln Lys
245 250 255
Arg Ile Asp Ala Val Arg Lys Phe Asp Lys Asp Ala Leu Arg Val Ser
260 265 270
Thr Ser Lys Arg Ala Glu Pro Arg Val Pro Phe Gly Gln Leu Val Glu
275 280 285
Arg Gly Met Leu Arg Pro Gly Glu Glu Leu Ser Ser Leu Asn Gly Arg
290 295 300

Arg Thr Ala Lys Val Arg Ala Asp Gly Thr Leu Val Ser Asn Asp Val

305 310 315 320

Lys Gly Ser Ile His Gln Val Gly Ala His Leu Glu Gly Ala Pro Ser

325 330 335

Cys Asn Gly Trp Thr Tyr Trp Thr Phe Lys Arg Asp Gly Lys Gln Val

340 345 350

Pro Ile Asp Val Leu Arg Gln Gln Ile Arg Ala Glu Met Asn

355 360 365